Aus dem anatomischen Institut der Friedrich-Wilhelm-Universität
zu Breslau
(Dir.: Prof. Dr. Blotevogel)

Über das Auftreten von Vit. C. in embryonalen Organen und über die Vit. C.-Synthese bei Mäusen bei Mangel an wasserlöslichen Vitaminen

---

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des ärztlichen Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Breslau

vorgelegt von

Günter Schmidtchen
Arzt aus Breslau

Breslau 1940

Breslauer Genossenschafts-Buchdruckerei, e.G.m.b.H., Breslau 1, Ursulinerstr. 1.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Breslau.

Referent: Prof. Dr. Blotevogel

Dekan: Prof. Dr. Gottron.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

I.

Bekanntlich lassen sich in einer Reihe von innersekretorischen Organen wie Nebenniere, Keimdrüse und Hypophyse unter normalen Verhältnissen auf histo-chemischem Wege reichliche Mengen von Askorbinsäure nachweisen. Die Bedeutung der Askorbinsäure liegt vermutlich darin, daß sie in den Synthesevorgang der von den betreffenden Organen produzierten Hormone eingeschaltet ist. Es ist nun von Interesse zu erfahren, zu welchem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung Askorbinsäure in den betreffenden Organen auftritt, denn diese Beobachtungen geben eine gewisse Handhabe für die Funktionsaufnahme des betreffenden Organes.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war nun, diese Verhältnisse bei der Nebenniere zu klären.

Zu den Versuchen wurden Kaninchen benützt, die unter gleichen Bedingungen gehalten wurden und deren Konzeptionstermin bekannt war. 15 tägige und 21 tägigeEmbryonen und Neugeborene kamen zur Auswertung.

Methodik:

Die Muttertiere wurden mit Äther getötet und sofort die Nebennieren den lebenden Embryonen entnommen. Diese wurden mit 4,5% Lävuloselösung abgespült und 30 Min. lang in 10% $AgNO_3$-Lösung, die mit einigen Tropfen Eisessig auf PH_3 gebracht wurde, eingelegt. Nach kurzem Spülen in aqua dest. wurden die Präparate 30 Min. lang gründlich in 3% Natriumthiosulfatlösung ausgewaschen, danach 10 Min. lang in aqua dest. und über 70% bis 100 % Alkohol in Paraffin eingebettet. Schnitte von 8 μ Dicke wurden hergestellt und mit Kernechtrot-Lichtgrün nachgefärbt.

Zunächst sei das Vit. C.-Bild der normalen Nebenniere vorangestellt. Bekanntlich finden sich Vit. C.-Beladungen in der Nebenniere nur in gewissen Rindenzellen, für gewöhnlich dagegen nicht im Mark. Nur im Gefolge plötzlicher und gehäufter Adrenalinausschüttung ist auch im Mark eine Vit. C.-Beladung

beobachtbar. In der Rinde des normalen erwachsenen Tieres ist das Verhalten der Vit. C.-Verteilung folgendermaßen: Die zona glomerulosa ist gewöhnlich von Vit. C. frei, dagegen sind die zona fasciculata und reticularis bei normaler Ernährung stark beladen, wobei der Vit. C.-Gehalt der Zellen gegen die zona reticularis zu etwas stärker ist als in der äußeren Fasciculatazone. In cytologischer Hinsicht ist das Vitamin C diffus-granulär im Protoplasma zwischen den Lipoidtröpfchen gelagert.

Die Untersuchung der embryonalen Stadien ergab folgendes:

Bei den 15 Tage alten Embryonen ist von einer Differenzierung der Nebennierenrinde kaum etwas zu erkennen. Ein schmaler Streifen an der Peripherie, der durch besonderen Kernreichtum auffällt, stellt die spätere zona glomerulosa dar. Nach dem Zentrum zu kommen Zellen, die groß und protoplasmareich sind, aber die typische Säulenanordnung vermissen lassen. Eine Trennung der einzelnen Zonen und des Markes ist in diesem Stadium noch nicht möglich. Das Organ weist nur sehr geringe Vit. C.-Einlagerung auf. Dieses ist in feiner Verteilung beinahe nur auf den schmalen kernreichen Glomerulosasaum beschränkt.

Die Organe der 21 Tage alten Embryonen zeigten bereits eine deutlichere, wenn auch noch schwach ausgeprägte Rindenstruktur. Die zona glomerulosa ist jetzt schon recht gut an den Zellhaufen kenntlich, die größeren protoplasmareichen Zellen der zona fasciculata ordnen sich an der Peripherie bereits in die radiär verlaufende Säulenstruktur ein. Nach dem Zentrum zu nimmt die Zellordnung ab. Eine Andeutung gewisser Zelldifferenzierungen um die Markvenen herum kann man noch nicht feststellen. Im Gegensatz zum 15 tägigen Embryo finden wir hier wesentlich mehr Vit. C. Dieses ist beinahe in den Zellen sämtlicher Schichten anzutreffen, wobei die Konzentration von der Peripherie nach dem Zentrum zu abnimmt. Auffallend ist eine beginnende Anhäufung von Vit. C. in der Golgizone einzelner Zellen, besonders in der zona fasciculata, aber auch in der zona glomerulosa.

Die Nebennieren der Neugeborenen sind schon in allen Schichten gut differenziert. Der Übergang der zona fasciculata in die zona reticularis ist nicht deutlich. Die deutliche Säulenanordnung der peripheren Zellen der zona fasciculata geht nach dem Zentrum zu in ungeordnete Zellhaufen über. Um die Markvenen sind die Zellen in Stränge und Anhäufungen gelagert und lassen große Räume zwischen sich frei. Reichlich Vit. C. findet sich in der zona fasciculata und

reticularis, geringere Mengen in der zona glomerulosa. Auch hier ist das Vit. C. hauptsächlich in feiner Verteilung in den Zellen eingelagert. Zahlenmäßig häufiger als in den oben beschriebenen Stadien finden wir hier Vit. C.-Beladung der Golgizone einzelner Zellen, und dieses sowohl in den Zellen der zona glomerulosa als auch besonders in denen der zona fasciculata.

Die Übertragung der eben dargestellten tierexperimentellen Ergebnisse auf die Auswertung entsprechender menschlicher embryonaler Organe stößt deswegen auf Schwierigkeiten, weil wir das Angebot an Vit. C. seitens der Mutter nicht an der Hand haben und somit die Vit. C.-Einlagerungen der einzelnen Stadien nicht vergleichen können.

So fanden wir in der Nebenniere eines 5 Monate alten Embryos reichlich Vit. C. in einem schmalen Rindensaum in diffuser Verteilung. Die Differenzierung der einzelnen Zonen ist sehr wenig fortgeschritten.

Das Organ eines Neugeborenen war beinahe völlig leer von Vit. C., es zeigte allerdings einige Spuren bereits beginnender Autolyse.

Das Organ eines anderen Neugeborenen wies wenig Vit. C. auf. Hier waren die einzelnen Zonen klar erkennbar, allerdings war von einer Zelldifferenzierung des Markraumes nichts zu erkennen. Das Vit. C. befand sich besonders in den Zellen der zona glomerulosa und reticularis, meist in diffuser Verteilung. Auch in diesem Stadium waren einige wenige Zellen mit einer verstärkten Vit. C.-Einlagerung vorhanden, die sich auf die beiden vorgenannten Zonen verteilten.

Aus den Beobachtungen ergibt sich also, daß schon sehr bald bei der eben beginnenden Rindengliederung eine ganz minimale Vit. C.-Beladung in den äußeren Fasciculataschichten beobachtet wird. Deutlich wird die Vit. C.-Beladung erst am 21. Tage beim Kaninchen, wobei besonders charakteristisch das Auftreten des Vit. C. am Golgi-Apparat ist. Offenbar erfolgt um diese Zeit ein stärkerer Einstrom von Vit. C. in die Zellen über den Golgi-Apparat, über den ja nach den Ergebnissen früherer Untersuchungen die Vit. C.-Beladung der einzelnen Zellen erfolgt. Es scheinen also um diese Zeit die chemisch-physikalischen Bedingungen im Protoplasma für die Hormonsynthese hergestellt zu sein, wobei das Vit. C. in seiner Eigenschaft als Redoxsystem das notwendige Redoxpotential im Protoplasma schafft.

Da nun gelegentlich die Ansicht geäußert wurde, daß bei jenen Tieren, die später auf die Außenzufuhr der Askobinsäure unbedingt angewiesen sind — die also Vit. C. nicht selbst syn-

thetisieren können — doch zu embryonaler Zeit eine beschränkte Askorbinsäureerzeugungsfähigkeit besteht, erschien es angebracht, auch embryonale Nebennieren von Tieren zu untersuchen, deren Muttertiere mit Skorbutkost ernährt wurden. Zu diesem Zweck wurden trächtige Meerschweinchen auf Skorbutkost gesetzt und analoge Untersuchungen wie oben beim Kaninchen durchgeführt. Die Tiere hatten unter dieser Belastung schon nach 8 Tagen einen so starken Gewichtsverlust, daß die Gefahr eines Abortes bestand. Es gelang uns trotz apathischen Verhaltens und großer Schwäche der Tiere diese noch 4 weitere Tage zu halten. Die Tiere wurden in morbidem Zustand mit Äther getötet. Bei der Herausnahme der Embryonen waren bereits einige tot und zeigten beginnende Mazeration. Die Organe der übrigen Embryonen, wie auch die Nebennieren der Muttertiere zur Kontrolle, kamen zur Auswertung.

Es zeigte sich, daß sich durch die histo-chemische Methode sowohl in den Nebennieren der Muttertiere als auch in denen der Embryonen kein Vit. C. nachweisen ließ.

Es ergibt sich daraus also, daß bei dem völligen Fehlen von Vit. C. in embryonalen Nebennieren keine Handhabe dafür besteht, daß sich das embryonale Meerschweinchen hinsichtlich der Vit. C.-Synthese anders verhält wie das erwachsene Tier.

II.

Kollath konnte zeigen, daß es bei Ratten durch Fortfall sämtlicher wasserlöslicher Vitamine gelingt, ein skorbutähnliches Krankheitsbild zu erzeugen. Der alleinige Mangel an Askorbinsäure in der Nahrung bleibt bei der Ratte und Maus ohne jede Folgen, weil diese Tiere bekanntlich in der Lage sind, ihren Bedarf an Askorbinsäure durch Synthese im eigenen Organismus zu decken. Der Skorbut als klinisches Krankheitsbild scheint demnach eine komplexe Ätiologie zu besitzen und nicht auf den alleinigen Mangel von Vit. C. zurückzugehen. Es galt nun aber zu klären, ob als Folge des völligen Fehlens der wasserlöslichen Vitamine etwa die Selbstsynthese von Askorbinsäure unterbunden bzw. in Mitleidenschaft gezogen wird, oder ob das skorbutähnliche Krankheitsbild, das dabei entsteht, eben doch nur gewisse symptomatische Ähnlichkeit mit dem bei anderen Tieren durch alleinigen Askorbinsäuremangel entstehenden Ausfallsbilde aufweist. Um diese Frage zu klären, war es notwendig festzustellen, ob das histo-chemische Vit. C.-Bild in normaler Weise Vit. C.-haltigen Organen bei einer Ernährung, die frei von wasserlöslichen Vitaminen ist, irgendwelche Änderungen aufweist. Als Testobjekt für den Vit. C.-Nachweis wurde wiederum die Nebennierenrinde benützt.

18 weiße Mäuse im Gewicht von 10 g bis 18,5 g wurden unter folgender Kost gehalten:

67% Reisstärke — 25% Casein — 6% Zucker — 2% Salzgemisch autoclaviert 10 g Sesamöl.

Außerdem erhielten die Tiere das Vit. A. durch wöchentliche einmalige Injektion von 0,1 cm^3 einer 1 : 100 Voganlösung und das Vit. D. durch Quarzlampenbestrahlung, die 2 mal wöchentlich 3 Min. lang durchgeführt wurde.

Das Bestreben ging dahin, die Tiere möglichst lange unter dieser Kost zu halten, um mit Sicherheit einen Skorbut zu erzielen. Obwohl die Mäuse langsam an die veränderten Lebensbedingungen gewöhnt wurden, konnte man schon nach wenigen Tagen eine merkliche Gewichtsabnahme feststellen. 6 Tiere starben bereits vor dem Auftreten deutlicher Mangelerscheinungen und fielen deshalb bei der Auswertung fort. Die übrigen Tiere machten nach 13—14 Versuchstagen einen apathischen Eindruck, bewegten sich träge fort, hatten einen Gewichtsverlust von rund ⅓ ihres Körpergewichts, das Fell war struppig und ungepflegt, die Mehrzahl der Tiere bekamen Diarrhoeen, zum Teil blutigen Charakters. Trotz dieser Veränderungen war es möglich, Tiere bis zu 22 Versuchstagen zu halten. Die Tiere wurden mit Äther getötet und sofort die Vit. C. speichernden Organe, wie Nebennieren, Hypophysen und Keimdrüsen, entnommen und wie oben weiterbehandelt.

Die mikroskopische Untersuchung der Schnitte ergab, daß vor allem in der Nebennierenrinde — besonders in der zona fasciculata und reticularis — aber auch im Mark — allerdings nur in geringem Maße — reichlich Vit. C.-Einlagerung vorhanden war, und dies ohne Unterschied gegenüber normalen Tieren. Auch in den übrigen Organen ließ sich massenhaft Vit. C. nachweisen.

Aus diesen Versuchen ergibt sich also, daß die Vit. C.-Synthesefähigkeit des Organismus bei der Maus durch den Fortfall sämtlicher wasserlöslicher Vitamine keinerlei Änderungen erfährt. Die Selbstsynthese des Vit. C. geht also auch unter diesen Bedingungen ungestört vor sich. Das von Kollath beobachtete Auftreten für Skorbut typischer Knochenveränderungen muß also wohl entscheidend durch das Fehlen der übrigen wasserlöslichen Vitamine bedingt sein. Es erscheint daher angebracht, in diesen Fällen nicht von der experimentellen Erzeugung eines echten Skorbutes zu sprechen, da man diese Krankheitsbezeichnung besser für das durch den wirklichen Vit. C.-Mangel zustandekommende Ausfallsbild reservieren sollte.

Ergebnis:

I.

1. In der embryonalen Nebenniere tritt beim Kaninchen etwa um die Mitte der Tragzeit die erste Vit. C.-Beladung in den Rindenzellen auf. Ein stärkerer Einstrom von Vit. C. erfolgt jedoch erst um den 21. Tag herum. Dieser geschieht über den Golgi-Apparat.
2. Eine Selbsterzeugung von Vit. C. läßt sich auf histo-chemischem Wege bei Meerschweinchenembryonen nicht nachweisen.

II.

Die Selbstsynthese von Vit. C. bei Nagetieren (Maus) geht auch beim Fehlen sämtlicher wasserlöslicher Vitamine in der Nahrung ungestört weiter vor sich.

Literaturangabe:

Christian Bomskov: Methodik der Vitaminforschung. Georg Thieme, Verlag, Leipzig 1935. Vit. B. u. Vit. C. S. 158 u. folg.

Kollath: Mikrobiologische Versuche als Grundlage der Vitaminforschung. Wiener Klinische Wochenschrift 1931 1. Band Nr. 9 u. Nr. 10.

Kollath u. Lotte Giesecke: Das Wachstumsproblem und die Frage des Zellersatzes in der Vitaminforschung. X. Mitteilung: Moeller-Barlowsche Krankheit und Skorbut. Archiv für experimentelle Pathologie u. Pharmakologie, Band 189 Seite 188.

Kollath u. L. Giesecke: Das Wachstumsproblem und die Frage des Zellersatzes in der Vitaminforschung. XI. Mitteilung: Lange Lebensdauer trotz Vitamin- und Mineralmangels und das Problem der Altersveränderungen. Archiv für experimentelle Pathologie u. Pharmakologie, Band 189 Seite 564.

Gerhard Skutta: Morphologisch faßbare Veränderungen bei B-Avitaminose. Ergänzungsheft zum Anatomischen Anzeiger, Band 88.

Stepp u. Ruzicka: Ergebnisse der Vitamin- und Hormonforschung. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1938.

E. Tonutti: Die Vitamin C. — Darstellung im Gewebe und ihre Bedeutung zur funktionellen Analyse vom Histiosystem. Zeitschrift für Mikroskopisch-Anatomische Forschung, Bd. 48 Heft 1.

Lebenslauf.

Ich, Günter Schmidtchen, wurde am 6. Dezember 1914 als Sohn des Polizei-Distriktkommissars Oswald Schmidtchen und seiner Ehefrau, geb. Rau, in Posen geboren. Nach Absolvierung der Grundschule und des Gymnasiums machte ich im Jahre 1935 am Maria-Magdalenen-Gymnasium zu Breslau das Abitur. Im Sommerhalbjahr 1935 war ich im Arbeitsdienst. Im Herbst 1935 begann ich an der Universität zu Breslau das Medizinstudium und machte daselbst im Jahre 1936 das Praephysikum und im Jahre 1938 das Physikum. Die klinischen Semester studierte ich in Kiel, Breslau und Leipzig. Am 12. August 1940 bestand ich das medizinische Staatsexamen an der Universität Leipzig.

Günter Schmidtchen.